

Applicazioni dell'ingegneria genetica in medicina

12

INTRODUZIONE

La pietra miliare dell'ingegneria genetica può probabilmente essere identificata nella scoperta del **clonaggio**, che consente di utilizzare un sistema cellulare per ottenere milioni di copie di una stessa molecola di **DNA ricombinante**. Quest'ultima si ottiene legando la molecola di DNA di interesse a un **replicone**, una sequenza di DNA capace di replicazione autonoma all'interno di una cellula ospite. Entrambe le molecole di DNA vengono tagliate con **endonucleasi di restrizione** (si veda il Capitolo 3) che producono *sticky end* (estremità adesive) complementari e sono successivamente saldate da una DNA ligasi (Figura 12.1). Si ottiene così una molecola circolare di DNA che contiene il replicone, o **vettore**, e la molecola di interesse, chiamata **inserto**. Per il clonaggio vengono applicati alcuni concetti fondamentali della biologia dei procarioti, in particolare la **trasformazione** (Figura 12.2), cioè la possibilità di inserire piccole molecole circolari di DNA, dette **plasmidi**, all'interno della cellula batterica e di ottenerne l'amplificazione. Il limite principale dell'applicazione dei plasmidi è la dimensione dell'inserto che può raggiungere solo poche kilobasi. Nel corso degli anni si sono resi disponibili vettori di capacità sempre maggiore (Tabella 12.1) come anche sistemi cellulari diversi dai procarioti, quali lieviti o cellule di mammifero. Se la cellula ospite proviene da un mammifero, anziché di trasformazione, si parla di **transfezione**. Nel caso della trasformazione, il DNA plasmidico non viene inserito nel genoma batterico, rimane cioè in forma **episomiale**. Nella transfezione, il plasmide può rimanere in forma episomiale oppure essere integrato nel genoma dell'ospite (Figura 12.3). Nel primo caso, la molecola di DNA ricombinante si perde nel corso di alcuni cicli di replicazione cellulare. Nel caso dell'integrazione nel genoma dell'ospite, si ha una modificazione permanente del genoma stesso e il DNA esogeno viene trasmesso alle cellule figlie nel corso della mitosi, oppure in maniera mendeliana alla prole nel corso della riproduzione. Un'applicazione specifica del clonaggio sopra descritto è il cosiddetto **clonaggio genico**, che consente di clonare un

intero gene di una data specie, per ottenerne l'espressione in una specie differente. Come si vedrà più avanti, questa metodica viene largamente utilizzata in numerosi settori della biologia molecolare, per le applicazioni più svariate. Per il clonaggio genico, sono disponibili da ormai diversi anni i cosiddetti **vettori di espressione** che consentono non solo di amplificare l'inserto, ma anche di ottenerne l'espressione (vale a dire trascrizione ed eventualmente traduzione). I vettori di espressione, oltre a essere capaci di replicazione autonoma, possiedono anche un promotore che regola la trascrizione dell'inserto. Tuttavia, poiché la maggior parte dei geni eucariotici è di dimensioni troppo grandi per la capacità media di trasporto dei vettori più comunemente utilizzati (si vedano la Tabella 12.1 e il Capitolo 1), anziché clonare un intero gene eucariotico, si

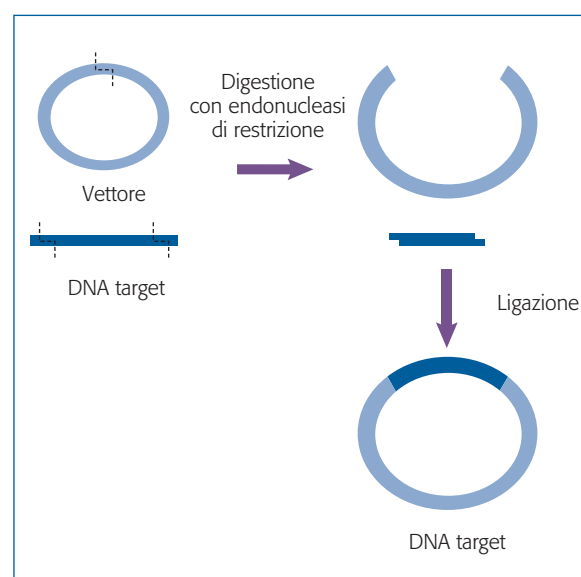


FIGURA 12.1 - La costruzione di una molecola di DNA ricombinante si basa sulla presenza di siti di riconoscimento di endonucleasi di restrizione (linea tratteggiata) che producono sticky end complementari sia sul vettore sia sull'inserto. La DNA ligasi catalizza la formazione della molecola ricombinante di DNA circolare.

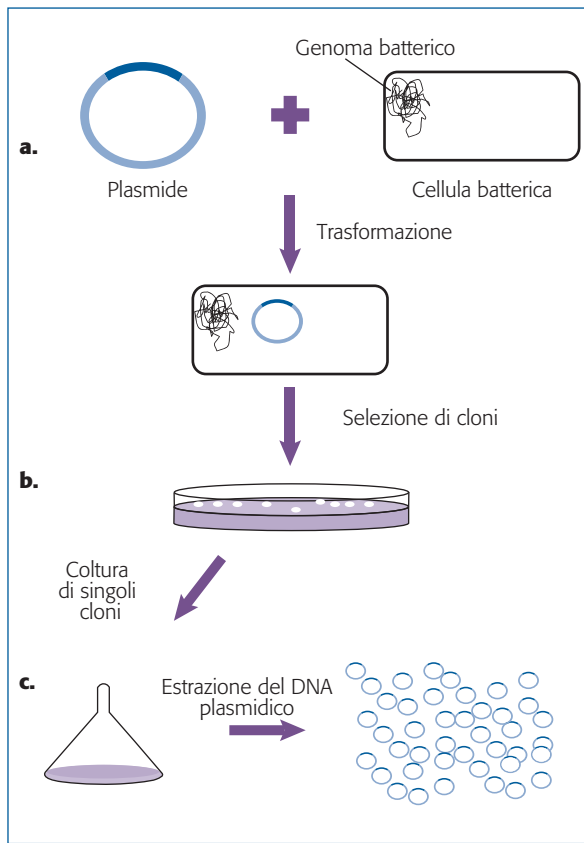


FIGURA 12.2 - La trasformazione consiste nell'inserimento di un plasmide all'interno della cellula batterica (a). Le cellule trasformate vengono selezionate in coltura mediante geni di resistenza ad antibiotici (b). Le colonie trasformate vengono poi espanse in brodocolture. Il DNA ricombinante viene successivamente estratto dalle cellule batteriche (c).

ricorre all'uso del suo cDNA il quale, contenendo la sola sequenza codificante, è in genere di dimensioni ridotte. Inoltre, se il sistema scelto per l'espressione del gene si

Tabella 12.1 Caratteristiche principali dei vari tipi di vettori di clonaggio comunemente usati in biologia molecolare

Vettore di clonaggio	Dimensione dell'inserito
Vettori plasmidici standard	0-10 kb
Batteriofago λ (vettori di inserzione)	0-10 kb
Batteriofago λ (vettori di sostituzione)	9-23 kb
Vettori cosmidici	30-44 kb
Batteriofagi P1	70-100 kb
PAC (P1 Artificial Chromosome)	130-150 kb
BAC (Bacterial Artificial Chromosome)	Fino a 300 kb
YAC (Yeast Artificial Chromosome)	0,2-2,0 Mb

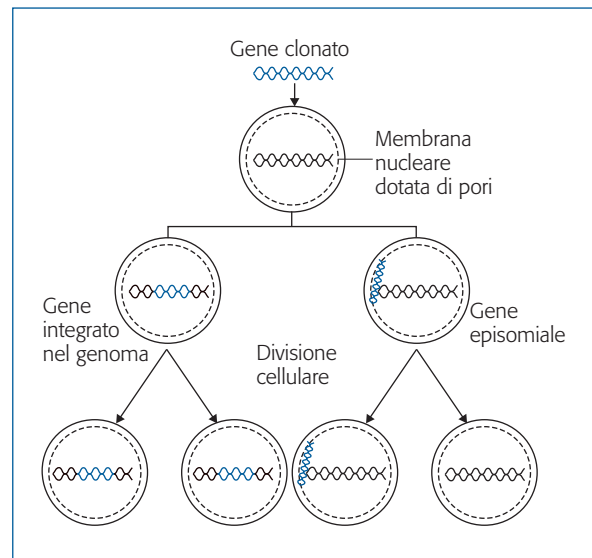


FIGURA 12.3 - La transfezione consiste nell'inserimento di DNA esogeno all'interno di cellule eucariotiche. Il DNA esogeno può essere integrato nel genoma dell'ospite ed essere quindi trasmesso alle cellule figlie nel corso della divisione cellulare. In alternativa, il DNA può restare in forma episomiale. In tal caso viene perduto nel corso di alcuni cicli di divisione cellulare. (Modificato da: Strachan T, Read AP. Human molecular genetics. 2nd ed. New York-London: Garland Science, 1999.)

basa sull'uso di cellule procariotiche, vi è l'ulteriore limitazione dell'incapacità delle cellule batteriche di effettuare lo splicing.

PROTEINE RICOMBINANTI

Nel corso degli anni l'ingegneria genetica ha senza dubbio compiuto passi da gigante, tuttavia le applicazioni pratiche nel campo della medicina clinica, con significative ricadute terapeutiche, sono finora limitate. Uno dei principali successi è sicuramente la produzione di **proteine ricombinanti**, ossia di proteine umane in sistemi non umani. Sino ad alcune decine di anni fa, proteine di importanza terapeutica notevole, quali l'insulina, l'ormone della crescita (GH) o il fattore VIII della coagulazione, erano ottenute da fonti animali o umane. Per esempio, una delle principali fonti di insulina era il pancreas di maiale, il GH veniva ottenuto primariamente dalle ipofisi di cadaveri, mentre il fattore VIII era ottenuto come emoderivato da siero umano.

Le complicanze erano notevoli: basti pensare alle reazioni immunitarie indotte dall'insulina porcina, ai rari casi di malattia di Creutzfeld-Jacob da GH o ai numerosissimi casi di infezione da HIV in pazienti emofiliaci, contratta da preparazioni di fattore VIII contaminate dal virus.

I primi e più semplici sistemi di produzione di proteine ricombinanti si sono basati sull'uso di batteri in cui veniva clonato un cDNA codificante per la proteina umana di interesse (Figura 12.4). Il limite principale di queste

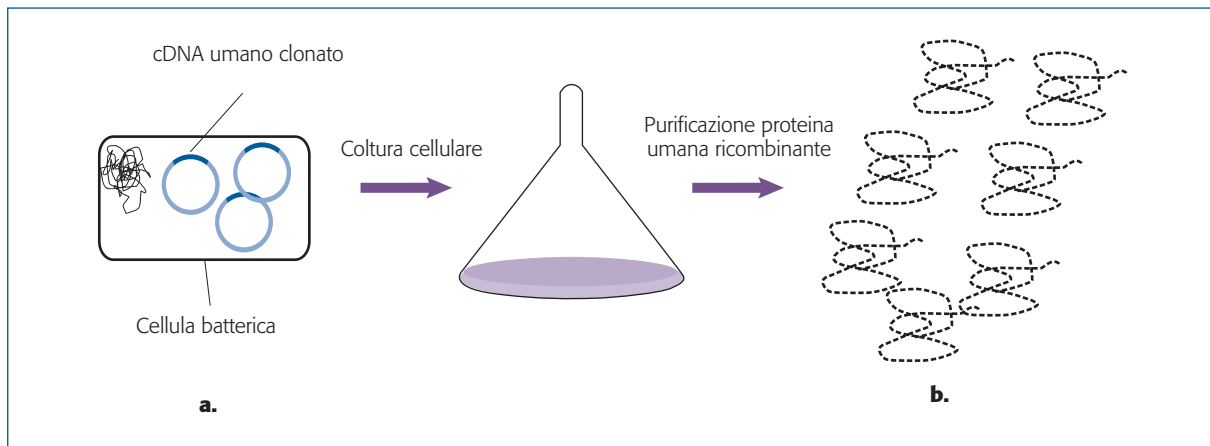


FIGURA 12.4 - Il cDNA umano può essere utilizzato per la produzione di proteine ricombinanti. A questo scopo, vengono clonati in vettori di espressione (a), il cui inserto può essere trascritto e tradotto in proteina. La proteina ricombinante viene successivamente purificata (b).

metodiche consiste nel fatto che la maggior parte delle proteine umane va incontro a modificazioni post-traduzionali, quali la glicosilazione, che i sistemi procariotici non sono in grado di effettuare. Pertanto trovano sempre maggiori applicazioni sistemi eucariotici per la produzione di proteine umane basati sull'uso di colture di cellule di mammifero.

Una possibile alternativa, futuribile, è l'uso di animali transgenici (si veda oltre): il gene umano di interesse potrebbe essere inserito nel genoma dell'animale ospite (per esempio ovis, bovini, volatili ecc.) e modificato in maniera tale che la proteina ricombinante venga secreta nel latte o nell'uovo dell'animale. Queste metodiche consentirebbero la produzione di proteine ricombinanti su larga scala. Un'altra applicazione simile si ha nella produzione di vaccini ricombinanti. In questo caso, i sistemi *in vitro* descritti sono utilizzati per produrre antigeni di virus o batteri, da iniettare nei pazienti da immunizzare. Metodiche di questo genere sono utilizzate, per esempio, per la produzione dei vaccini di ultima generazione, diretti contro il virus dell'epatite B.

MODELLI ANIMALI

Per capire l'importanza dello studio dei modelli animali nelle malattie genetiche è sufficiente coprire i due terzi inferiori della Figura 12.5: risulterà immediatamente evidente che è impossibile identificare le diverse specie sulla base delle sole caratteristiche morfologiche. Autore involontario di questo "esperimento" naturale fu, nel 1928, Karl von Baer, il quale si trovò nell'imbarazzo di non riuscire a identificare la specie di appartenenza di due embrioni che aveva dimenticato di etichettare. Lo sviluppo embrionale di un pesce, di una tartaruga, di un serpente o di un topo procede attraverso una serie di processi morfogenetici comuni che li rende praticamente indistinguibili nelle prime fasi embrionali. Per questo motivo, la *Drosophila*, il pollo o il topo sono stati utilizzati per

lo studio della biologia dello sviluppo in generale e delle malattie genetiche umane in particolare. È possibile quindi studiare specie diverse e giustificare poi la "pretesa" di trasferire all'uomo i risultati ottenuti, con la cautela che questo richiede. L'osservazione originaria effettuata da von Baer ha trovato un incredibile riscontro nel sequenziamento del genoma di varie specie animali evolutivamente distanti dall'uomo. Per esempio, il 99% dei geni murini è omologo di geni umani. Con l'introduzione delle tecniche di biologia molecolare è diventato possibile non solo cercare di determinare le conseguenze fenotipiche di una data mutazione, ma anche introdurre modifiche nel DNA di ogni specie e osservarne e studiarne i risultati. Oggi agli studi sulla *Drosophila*, sul pollo e sul topo si sono aggiunti quelli su *Danio rerio* (zebrafish) e *Caenorhabditis elegans*. Inoltre, per lo studio di molti processi di biologia cellulare si utilizzano spesso due modelli ancora più semplici ma estremamente importanti quali i batteri, come l'*Escherichia coli*, o i lieviti, come il *Saccharomyces cerevisiae*.

Il topo rappresenta il modello animale per eccellenza per lo studio delle malattie genetiche, in quanto è un mammifero con processi patologici sorprendentemente simili a quelli umani, anche più dei primati. Altre caratteristiche che rendono i topi attraenti come modelli animali sono le similitudini tra la fisiologia umana e quella murina, la brevità del ciclo riproduttivo (ci vogliono circa 8 settimane dal concepimento sino al raggiungimento della maturità sessuale) e l'elevato numero di embrioni per gravidanza. Ciò che lo rende assolutamente insostituibile è tuttavia la possibilità di ricreare in laboratorio, attraverso la tecnologia del *gene targeting*, topi portatori delle stesse mutazioni genetiche che si osservano nell'uomo.

Topi transgenici e topi knock-out

I topi ottenuti in seguito all'inserimento di un frammento di DNA nel genoma vengono comunemente chiamati **transgenici**. Questo termine viene applicato indistinta-

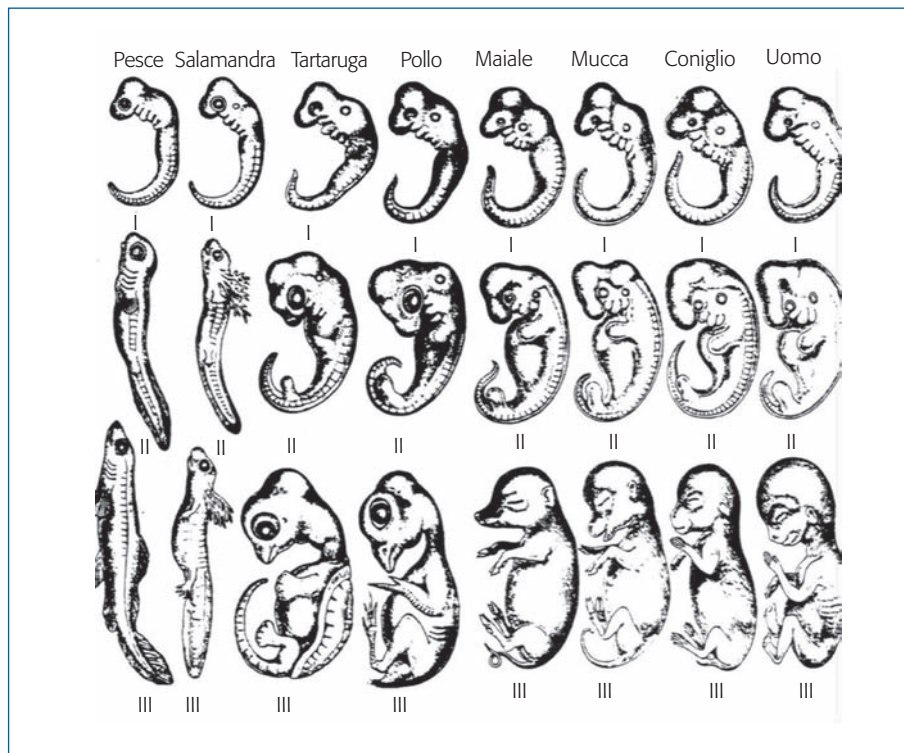


FIGURA 12.5 - Specie diverse presentano durante le prime fasi dello sviluppo embrionale una straordinaria identità morfologica. Solo successivamente è possibile identificare caratteristiche proprie di ciascuna specie. Questa osservazione rappresenta uno dei motivi fondamentali per cui organismi modello possono essere utilizzati per riprodurre malattie genetiche umane. (Tratta da: Gerhart J, Kirschner M. *Cells, Embryos, and Evolution*. Cambridge: Blackwell Science, 1997.)

mente sia a topi ottenuti attraverso tecniche transgeniche sia attraverso gene targeting (si veda oltre) per generare un topo knock-out (KO).

È tuttavia importante fare una chiara distinzione, non solo di tipo lessicale, tra le due tecnologie, in quanto la generazione di un topo geneticamente modificato utilizzando l'una o l'altra tecnologia porta a risultati completamente diversi e permette di rispondere a quesiti differenti. Nei prossimi paragrafi verranno indicate le caratteristiche fondamentali delle due tecniche.

Il primo topo con una modifica del DNA disegnata in laboratorio fu creato nel 1980. La tecnologia impiegata era la stessa che si utilizzava all'epoca per inserire un frammento di DNA nelle cellule coltivate *in vitro*. In base a questa tecnica viene preso un frammento di DNA (di solito un gene sotto il controllo di un promotore) e viene iniettato nel pronucleo maschile di una cellula uovo appena fecondata. Il frammento di DNA si integra stabilmente nel DNA genomico e il topo ottenuto sarà portatore dello specifico transgene in ogni sua cellula (Figura 12.6). Tale procedura permette di inserire in maniera stabile un qualunque frammento di DNA nel genoma di topo, ma si accompagna ad alcuni problemi specifici: spesso il frammento viene inserito in copie multiple e questo in molti casi determina il silenziamento trascrizionale del gene inserito; inoltre non è possibile controllare il sito di inserzione e quindi, anche se raramente, l'inserimento

di un transgene può causare l'inattivazione di un gene endogeno (**mutagenesi inserzionale**); infine questa tecnica permette soprattutto di riprodurre nel topo quelle condizioni in cui vi è un "eccesso" di dose o un effetto dominante negativo.

La tecnica del **gene targeting**, creata nel laboratorio di Mario Capecchi, ha superato tutti questi problemi in quanto ha permesso di introdurre nel genoma murino qualunque modifica, in uno specifico *locus*, permettendo di riprodurre nel topo virtualmente qualsiasi fenotipo umano. L'idea di base è piuttosto semplice e sfrutta l'apparato di riparazione del DNA, e in particolare quello della ricombinazione omologa (si veda il Capitolo 2). Se viene introdotta all'interno di una cellula in coltura una molecola di DNA di circa 10 kb omologa alla regione che deve essere modificata, insieme a un vettore di targeting, e contenente una specifica variazione della sequenza nucleotidica, gli apparati di ricombinazione omologa vengono "convinti" a sostituire la sequenza nucleare originale con la sequenza modificata (Figura 12.7). Questo evento è abbastanza raro e avviene con una frequenza di circa 1:100.000; tuttavia è possibile selezionare le cellule modificate introducendo nel vettore di targeting un gene, ovvero un marcatore di selezione, che conferisce la resistenza a uno specifico antibiotico. Il trattamento delle cellule con lo specifico antibiotico permetterà la sopravvivenza soltanto di quei cloni in cui è avvenuta

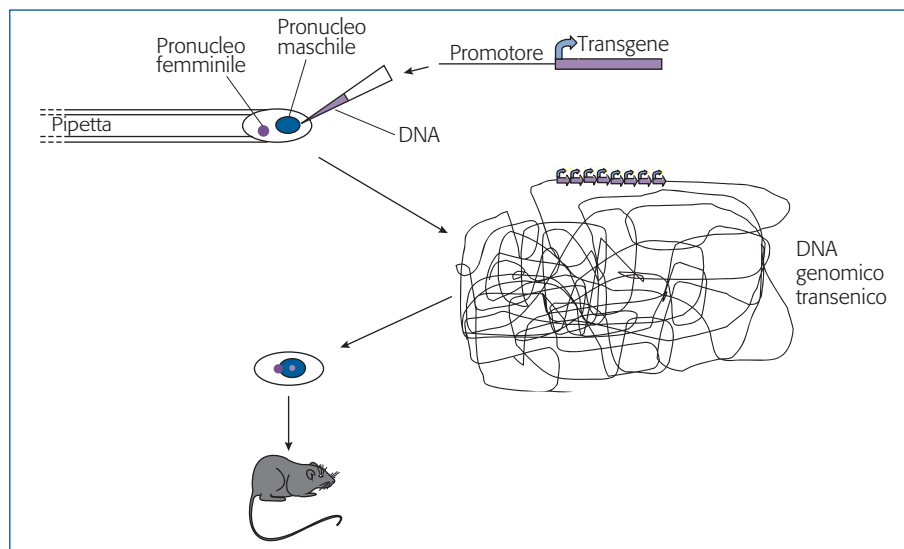


FIGURA 12.6 - Per generare un topo con tecniche transgeniche è sufficiente iniettare nel pronucleo maschile di una cellula uovo fecondata un frammento di DNA (di solito un gene regolato da un promotore). Questo frammento verrà riarrangiato e inserito in copie multiple in un *locus* a caso nel DNA genomico. Il topo derivante sarà portatore di questa modifica in ogni cellula ed esprimerà il transgene nelle cellule in cui quel determinato promotore viene espresso.

la ricombinazione omologa con il vettore di targeting e quindi la generazione di un clone cellulare portatore di una specifica modifica nel DNA. Dal momento che le cellule in cui viene effettuata questa modifica sono cellule staminali embrionali (*Embryonic Stem Cells*, o *ES cells*) in grado di generare un topo adulto, il risultato finale sarà un animale portatore in ogni cellula della modifica nel DNA che è stata introdotta (Figura 12.8). Con questo approccio è possibile introdurre qualunque tipo di mutazione missenso, nonsense, delezioni puntiformi o di intere regioni genomiche nell'ordine di megabasi, è possibile creare traslocazioni o duplicazioni e attraverso le comuni tecniche di biologia cellulare è possibile arrivare alla creazione di topi portatori di interi cromosomi umani. Tale procedura richiede un periodo di tempo piuttosto lungo (da 6 mesi a 1 anno) per arrivare alla generazione di un topo portatore di una specifica modifica, e di conseguenza i costi sono

alquanto elevati. Le caratteristiche più importanti dei topi ottenuti con tecniche transgeniche e attraverso gene targeting sono riassunte nella Tabella 12.2.

Mutagenesi condizionale

Uno degli effetti immediati del gene targeting è stata la possibilità di inattivare dei geni e di poterne studiare in questo modo la funzione attraverso il fenotipo che ne deriva (da qui il nome di topi KO). Il problema che è emerso immediatamente è il fatto che molti geni hanno un ruolo fondamentale e insostituibile in molti processi di sviluppo dal concepimento fino alla fine dello sviluppo embrionale, e quindi spesso il risultato ottenuto era la perdita molto precoce degli embrioni anziché il fenotipo che si voleva studiare. Questo ha permesso di identificare la funzione di molti geni coinvolti in fasi precoci dello sviluppo, costituendo però al tempo stesso un ostacolo insormontabile per lo studio di eventi tardivi. Per esempio, da studi in embrioni di pollo e dall'analisi dell'espressione in embrioni di topo, *Fgf8* era ritenuto un gene fondamentale nello sviluppo degli arti, del sistema nervoso centrale e del cuore. Lo sviluppo embrionale del primo topo KO per *Fgf8* si interrompeva tuttavia durante la gastrulazione, in quanto *Fgf8* era cruciale durante il processo di generazione del mesoderma e non permetteva l'analisi del ruolo di *Fgf8* nei processi morfogenetici più tardivi. Questo ostacolo è stato superato attraverso l'introduzione del sistema *Cre/LoxP* o della *mutagenesi condizionale*.

Il batteriofago P1 inserisce il proprio genoma nel DNA batterico utilizzando un enzima, la Cre ricombinasi, in grado di riconoscere due sequenze specifiche di 34 basi (chiamate *Locus of crossover(x) in P1* o *siti LoxP*), una sul

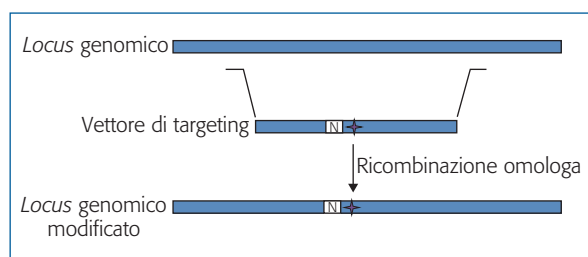


FIGURA 12.7 - Rappresentazione schematica di un esperimento di gene targeting. Il vettore di targeting è un plasmide contenente circa 10 kb di DNA identico alla regione che viene sostituita, salvo che per la mutazione che si vuole inserire (la stella) e il gene di resistenza a un antibiotico, la neomicina (N), per permettere la selezione delle cellule ricombinanti. Alla fine del processo il *locus* genomico conterrà esclusivamente la modifica inserita dai vettori di targeting.

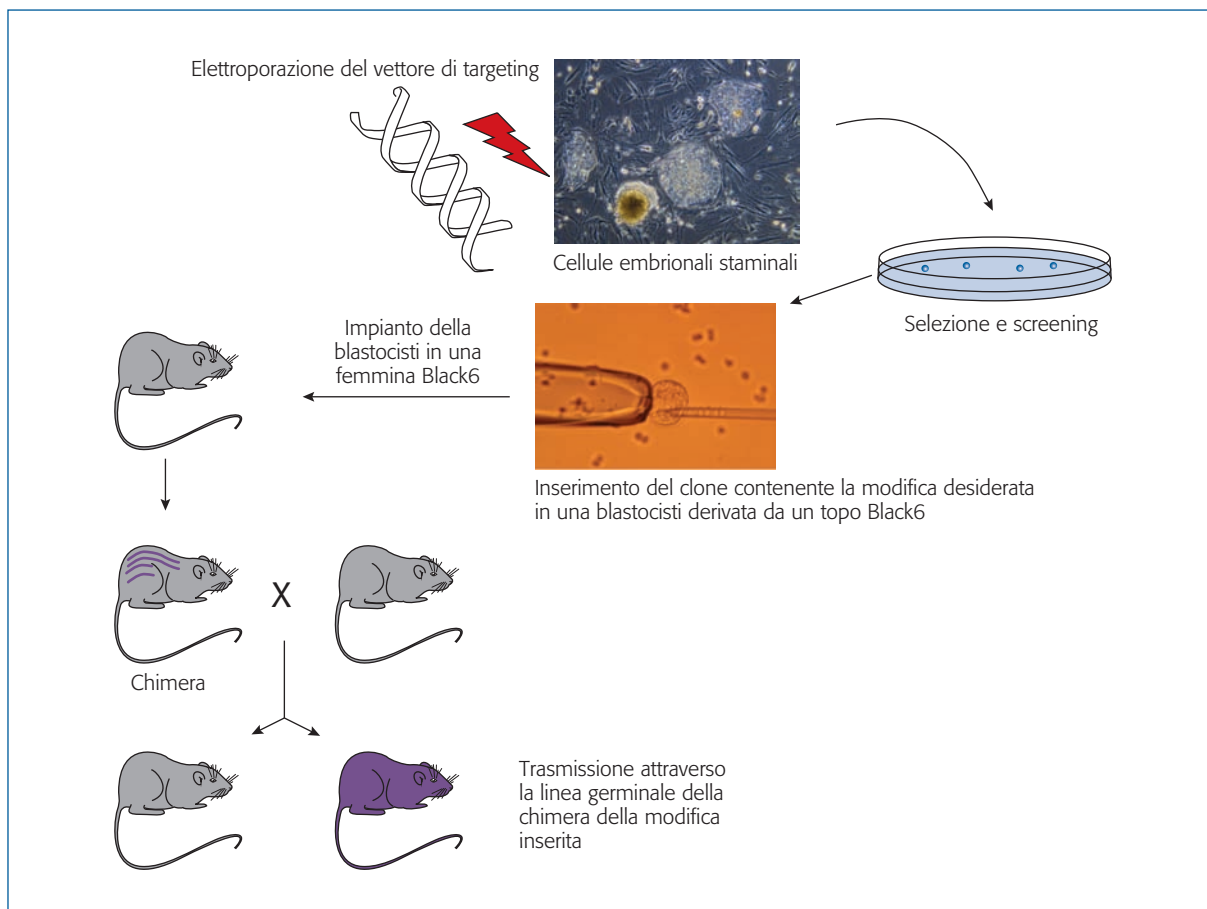


FIGURA 12.8 - Gene targeting. Il vettore di targeting viene introdotto nelle cellule ES di topo mediante elettroporazione. I cloni vengono selezionati con neomicina che elimina selettivamente tutte le cellule prive del vettore di targeting. I cloni verranno poi analizzati con il metodo Southern blot per verificare che il processo di ricombinazione omologa sia avvenuto in maniera corretta. Le cellule ES modificate verranno inserite in una blastocisti che verrà poi impiantata in un topo femmina preparato alla gravidanza. Per poter seguire agevolmente la localizzazione delle cellule ES viene adottato un trucco: le cellule ES derivano da un ceppo di topi con il mantello di colore marrone (codificato dal *locus agouti*), dominante rispetto al mantello di colore nero. Per questo motivo sia la blastocisti sia tutti gli incroci successivi verranno effettuati con topi derivati dal ceppo C57Black6, di colore nero. La blastocisti con le cellule ES transgeniche inserite darà origine a un animale chimerico, con il mantello bicolore, nero e marrone. Agli incroci successivi, la nascita di topi di colore marrone sarà indice che mediante le cellule ES transgeniche la modifica introdotta con il vettore di targeting è stata trasmessa attraverso la linea germinale. Nella figura il colore nero del mantello corrisponde al grigio, mentre il colore marrone-agouti al viola.

proprio DNA e l'altra nel DNA batterico, e di guidare una ricombinazione sito-specifica tra le due. Quando le due sequenze si trovano sulla stessa molecola di DNA nello stesso orientamento, il tratto di DNA che si trova fra i due siti LoxP viene deletato e rimane un solo sito LoxP (Figura 12.9). L'introduzione di questo sistema nel topo ha iniziato l'era della mutagenesi condizionale. Tornando all'esempio di *Fgf8*, è stato quindi creato, mediante gene targeting, un topo transgenico per *questo gene* i cui esoni sono stati fiancheggiati da due sequenze LoxP. Questo allele contiene solo due sequenze extra di 34 basi localizzate negli introni e dal punto di vista funzionale è indistinguibile da un allele *wild-type*. Quando questo topo omozigote viene incrociato con un topo portatore del gene della Cre ricombinasi espresso da un promotore in una determinata struttura e in una determinata fase dello sviluppo (per esempio, il cervello o gli abbozzi degli arti

o del cuore), il topo portatore di entrambe le modifiche (i siti LoxP e la Cre ricombinasi) sarà un mosaico funzionale di *Fgf8*. Laddove Cre viene espressa, *Fgf8* verrà inattivato, mentre in tutti gli altri tessuti sarà funzionalmente attivo (Figura 12.10). Questo sistema è talmente importante da aver rimpiazzato completamente la generazione di un KO "diretto", in quanto oltre alla possibilità di superare un'eventuale precoce letalità permette di attribuire il fenotipo osservato esclusivamente al tessuto dove la Cre viene espressa (Figura 12.11).

TERAPIA GENICA

Uno degli obiettivi della genetica umana e medica è da sempre il trattamento causale delle malattie genetiche e, attraverso la correzione del difetto genetico presente in un

Tabella 12.2 Differenze principali tra topi generati attraverso gene targeting e con tecniche transgeniche

Gene targeting	Topi transgenici
È possibile introdurre qualsiasi modifica	Solo mutazioni con gain of function o transgeni
Procedura più costosa e più lunga (circa 6 mesi)	Procedura più economica e rapida (circa 2 mesi)
Bassa efficienza	Efficienza elevata
Preciso controllo della modifica che viene introdotta	Nessun controllo sul sito di integrazione, rischio di mutagenesi da inserzione Richiede una conoscenza a priori del promotore o dell'enhancer che esprime il transgene I livelli di espressione sono variabili, dipendono dal sito di inserzione e sono inversamente correlati al numero di copie del transgene inserito

paziente, il ripristino del corretto funzionamento cellulare. Le applicazioni possibili della terapia genica sono estremamente vaste e vanno dalle malattie mendeliane classiche ad alcune malattie infettive (per esempio, l'infezione da HIV) e, soprattutto, ai tumori. In linea di principio, viene distinta la **terapia genica su cellule germinali** da quella su **cellule somatiche**. Nel primo caso, viene indotta una

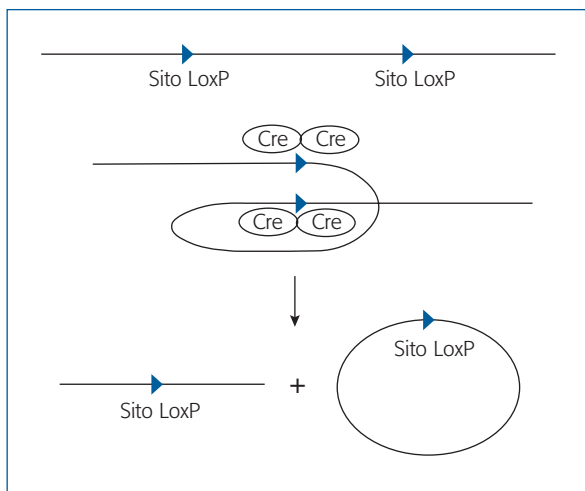


FIGURA 12.9 - Rappresentazione schematica del meccanismo d'azione del sistema Cre/LoxP. Quando due siti LoxP si trovano sulla stessa molecola di DNA, due molecole dell'enzima Cre stabiliscono un legame covalente proteina-DNA che successivamente porterà al crossover tra i due frammenti di DNA con la conseguente delezione del DNA contenuto tra i due siti LoxP. L'altra molecola di DNA circolare così formata verrà persa.

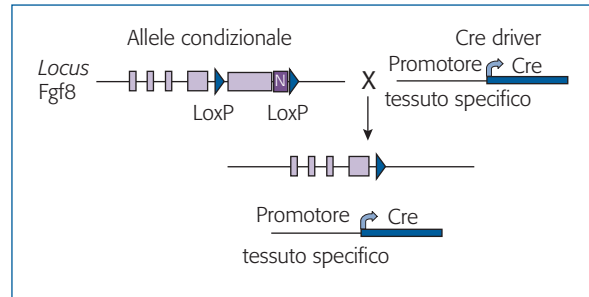


FIGURA 12.10 - Rappresentazione schematica della strategia utilizzata per creare un allele condizionale per *Fgf8*. Sono stati inseriti due siti LoxP negli introni a monte e a valle del quinto esone di *Fgf8*, insieme al gene di resistenza per la neomicina (N). Questo allele si comporta come un allele wild-type. L'incrocio con un topo portatore di un transgene che esprime l'enzima Cre in un determinato gruppo di cellule permetterà di generare un animale doppio transgenico, mosaico per l'allele nullo solo ed esclusivamente nel tessuto dove la Cre ricombinasi viene espressa.

modificazione del genoma a livello dei gameti, dello zigote o nel corso delle prime fasi dello sviluppo embrionale, in modo che sia presente in tutte le cellule dell'organismo. Le implicazioni etiche e le possibili conseguenze biologiche sullo sviluppo sono così importanti che questo tipo di approccio è espressamente proibito dalla maggior parte delle legislature mondiali in tema di bioetica.

L'approccio alternativo è quello della terapia genica su **cellule somatiche**. In questo caso, soltanto alcuni organi o tessuti di un organismo sono bersaglio della terapia genica e le eventuali modificazioni genetiche sono limitate all'individuo e non sono trasmissibili alla prole. Gli obiettivi della terapia genica sulle cellule somatiche possono essere molteplici:

- **aumento dell'espressione di un gene:** è particolarmente utile nel caso di mutazioni loss of function, in cui il fenotipo di una determinata condizione è dovuto ad aploinsufficienza;
- **sostituzione di un gene:** consiste nella sostituzione di un gene mutato con uno regolarmente funzionante; è l'obiettivo più ambizioso e difficile da raggiungere;
- **silenzimento dell'espressione genica:** può essere utile in caso di malattie mendeliane dovute a mutazioni gain of function, in cui la proteina mutata espleta prevalentemente un effetto tossico o dominante negativo sulla proteina wild-type. Altre applicazioni possono essere, per esempio, il silenzimento di oncogeni in caso di neoplasie, oppure, nel caso di malattie autoimmuni, la repressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria;
- **ablazione cellulare mirata:** questa applicazione è particolarmente utile in campo oncologico, in quanto consente l'ablazione mirata delle sole cellule neoplastiche, preservando le cellule normali.

Nel corso degli ultimi quindici o vent'anni, la terapia genica ha avuto periodi di alterne fortune: dopo un forte ottimismo iniziale, gli insuccessi degli anni Novanta hanno ridimensionato molto le aspettative dei ricercatori e,

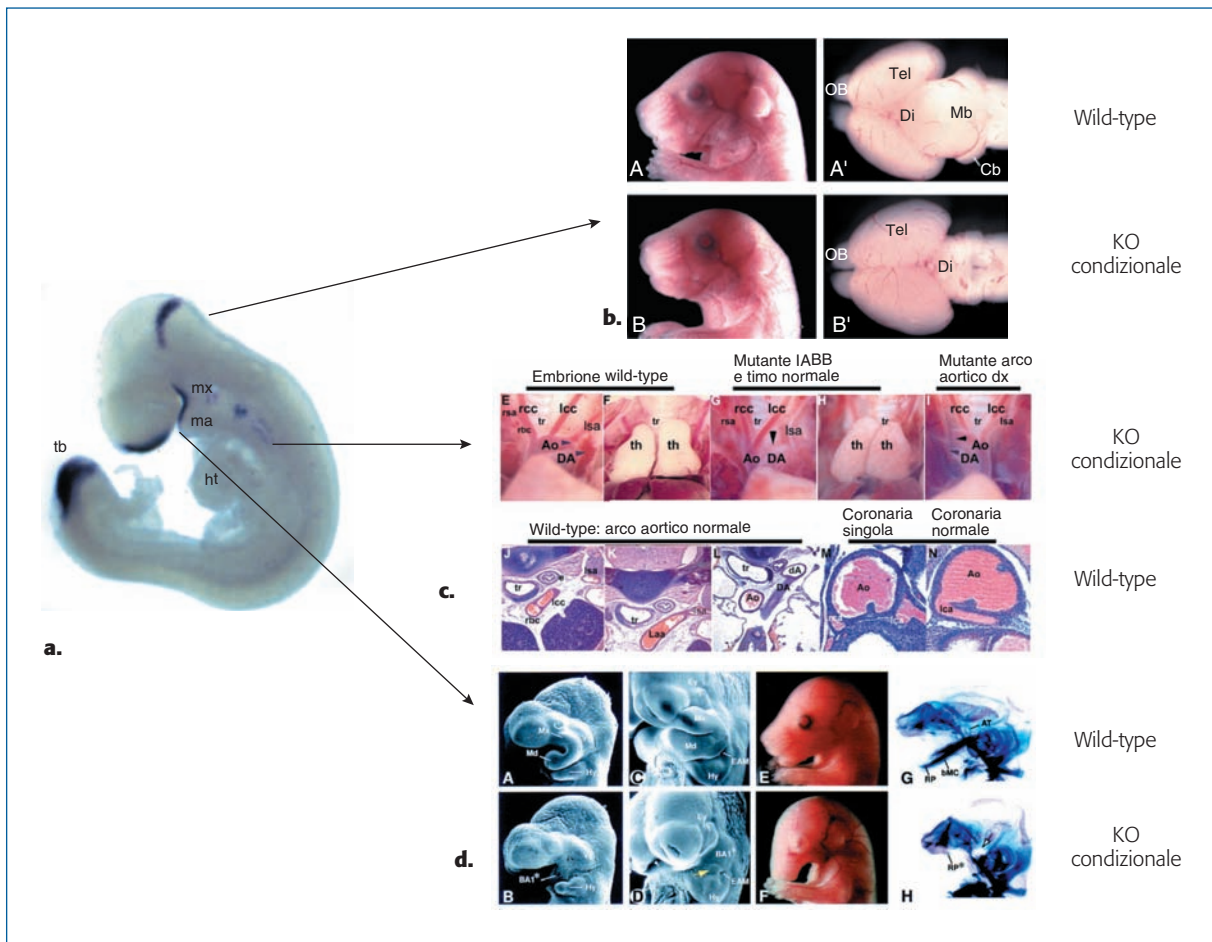


FIGURA 12.11 - Embrione di topo di 9 giorni che mostra in blu i distretti in cui viene normalmente espresso *Fgf8* (a). Il risultato del KO, mediante mutagenesi condizionale, di tre diversi esperimenti in cui l'allele condizionale *Fgf8* è stato inattivato in diversi distretti embrionali, controllando l'espressione di Cre con diversi promotori tessuto-specifici. Uso di un promotore espresso in maniera specifica nel mesencefalo (b). (Da: Chi et al. The isthmus organizer signal FGF8 is required for cell survival in the prospective midbrain and cerebellum. *Development* 2003, 130: 2633-2644.) La Cre ricombinasi viene espressa nell'abbozzo del cuore; l'embrione è di 17,5 giorni (c). (Da: Macatee et al. Ablation of specific expression domains reveals discrete functions of ectoderm- and endoderm-derived FGF8 during cardiovascular and pharyngeal development. *Development* 2003, 130: 6361-6374.) IAAB=arco aortico interrotto di tipo B; rsa=arteria succlavia destra; lsa=arteria succlavia sinistra; rbc=tronco brachicefalico destro; lbc=tronco brachicefalico sinistro; rcc=carotide comune destra; lcc=carotide comune sinistra; Laa=arco aortico di sinistra; dA=aorta discendente; lca=aorta coronaria sinistra; tr=trachea; th=timo; Ao=aorta ascendente; DA=dotto arterioso. Il Cre driver è specifico per la regione che darà origine all'osso mascellare (d). (Da: Trumpp et al. Cre-mediated gene inactivation demonstrates that FGF8 is required for cell survival and patterning of the first branchial arch. *Genes and Development* 1999, 13: 3136-3149.) BA1=primo arco branchiale; EAM=meato acustico esterno; Ey=occhio; Hy=arco dell'osso ioide; Mx=processo mascellare; Md=osso mandibolare.

in misura minore, dell'opinione pubblica. Sono tuttavia in corso numerosi studi clinici controllati di terapia genica, prevalentemente in campo oncologico.

Terapia genica su cellule somatiche: inserimento di un gene nelle cellule bersaglio

I fattori che maggiormente hanno limitato il successo dei protocolli di terapia genica effettuati fino a oggi sono diversi:

- la disponibilità di vettori in grado di trasportare quantità adeguate di materiale genetico;
- il raggiungimento delle cellule bersaglio;
- l'ottenimento di transfezioni di lunga durata;

- l'integrazione del gene in *loci* specifici nel genoma dell'ospite;
- il raggiungimento di livelli terapeutici di proteina ricombinante nel tessuto bersaglio.

La somministrazione del materiale genetico alle cellule bersaglio può essere effettuata secondo due modalità (Figura 12.12): le cellule del paziente vengono prelevate, geneticamente modificate in laboratorio e re-iniettate nel paziente (modalità *ex vivo*); oppure il trasferimento del materiale genetico avviene direttamente all'interno dell'organismo del paziente (*in vivo*).

L'approccio *ex vivo* è in genere preferibile, perché è più facilmente controllabile e consente di ridurre i rischi legati

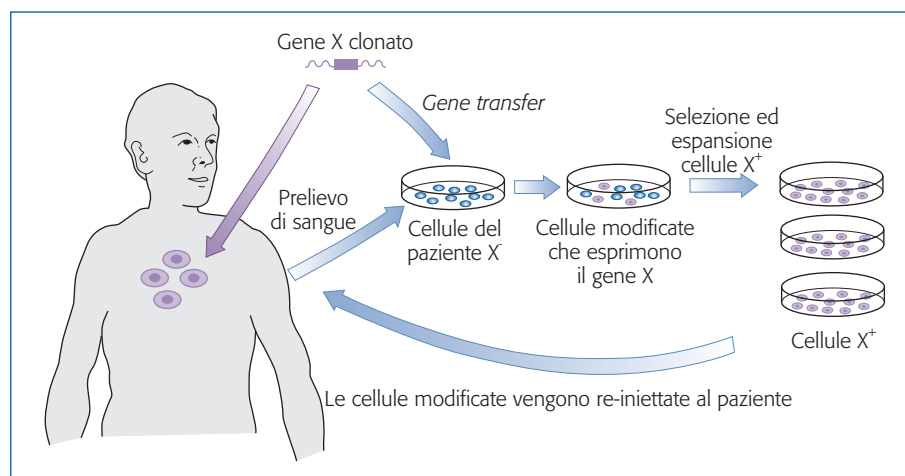


FIGURA 12.12 - Approccio *ex vivo* e *in vivo* di terapia genica. Nell'approccio *ex vivo*, alcune cellule di un paziente che presenta un deficit del gene X, vengono prelevate, il difetto genetico viene corretto *in vitro* e, successivamente, le cellule vengono reintrodotte nel paziente. Nell'approccio *in vivo*, il vettore di terapia genica viene iniettato direttamente nel paziente. (Modificata da: Strachan T, Read AP. Human molecular genetics. 3rd ed. New York-London: Garland Science, 2003.)

alla somministrazione sistemica di materiale genetico. Questo approccio non è però applicabile nei casi in cui le cellule bersaglio siano difficilmente accessibili o disponibili in quantità limitate (per esempio, le cellule neuronali o muscolari).

Come nel caso delle trasfezioni di cellule eucariotiche in generale, il DNA esogeno somministrato alle cellule bersaglio può restare in forma episomiale o integrarsi nel genoma dell'ospite. Entrambe le evenienze presentano vantaggi e svantaggi: l'integrazione nel genoma, al contrario della forma episomiale consente una maggiore durata dell'espressione del gene; tuttavia, dal momento che l'integrazione avviene in maniera casuale, l'espressione del gene esogeno può variare da cellula a cellula e dipende dalla regione genomica in cui avviene l'integrazione. Può infatti accadere che il gene esogeno non venga espresso affatto, venga espresso a livelli non terapeutici o venga espresso solo transitoriamente. L'evenienza peggiore è che il frammento di DNA inserito possa inattivare un gene endogeno per mutagenesi inserzionale o attivare l'espressione di un oncogene, determinando la trasformazione neoplastica della cellula bersaglio. Quest'ultimo evento è stato descritto in almeno due casi di pazienti affetti da un immunodeficit combinato grave e trattati con terapia genica (si veda oltre). Entrambi i pazienti sono deceduti in seguito a leucemia secondaria alla terapia genica.

Soprattutto nel caso dell'approccio *in vivo*, uno dei limiti principali all'efficacia della terapia genica è il raggiungimento del tessuto bersaglio e l'opportuno inserimento del DNA esogeno all'interno delle cellule. Sono state sviluppate numerose strategie per superare questi ostacoli e sono stati prodotti tipi diversi di vettori per il cosiddetto *gene delivery* che possono essere distinti in due categorie principali: **vettori virali** (Figura 12.13a) e **vettori non-virali** (Figura 12.13b). I vettori più comunemente usati sono quelli virali, che appartengono a cinque gruppi: 1)

retrovirus, 2) lentivirus, 3) adenovirus, 4) herpes simplex virus, 5) virus adeno-associati.

RETROVIRUS

Sono virus a RNA che presentano una modalità di infezione delle cellule bersaglio piuttosto peculiare, dal momento che vengono dapprima copiati in un intermedio a DNA da una DNA polimerasi-RNA dipendente (**trascrittasi inversa**) e successivamente integrati nel genoma ospite. Appartengono a questa classe alcuni virus oncogeni (si veda il Capitolo 10). Quelli utilizzati come vettori in terapia genica sono retrovirus difettivi, mantengono cioè la capacità di infettare le cellule bersaglio ma non quella di riprodursi. Presentano alcuni svantaggi, come quello di infettare solo cellule in fase attiva di replicazione; tra i vantaggi vi sono la facile integrazione nel genoma e la capacità di trasportare grandi quantità di materiale genetico (fino a 8 kb).

LENTIVIRUS

Appartengono alla stessa famiglia dei retrovirus, ma presentano il vantaggio di infettare anche cellule non in fase di replicazione attiva. Il virus HIV appartiene a questo gruppo. Al pari dei retrovirus, il genoma virale tende a integrarsi nel genoma ospite in maniera del tutto casuale.

ADENOVIRUS

Sono virus patogeni a DNA responsabili di alcune infezioni comuni. Infettano numerosi tipi cellulari differenti, anche cellule non in replicazione attiva, ma si integrano raramente nel genoma dell'ospite, per cui nei protocolli di terapia genica con questo tipo di vettori è necessario effettuare somministrazioni ripetute. Il limite maggiore alla loro applicazione è che scatenano risposte infiammatorie nell'organismo dell'ospite per cui dopo pochi cicli, la somministrazione diventa inefficace. Anche gli adenovirus possono trasportare fino a 7-8 kb di DNA genomico.

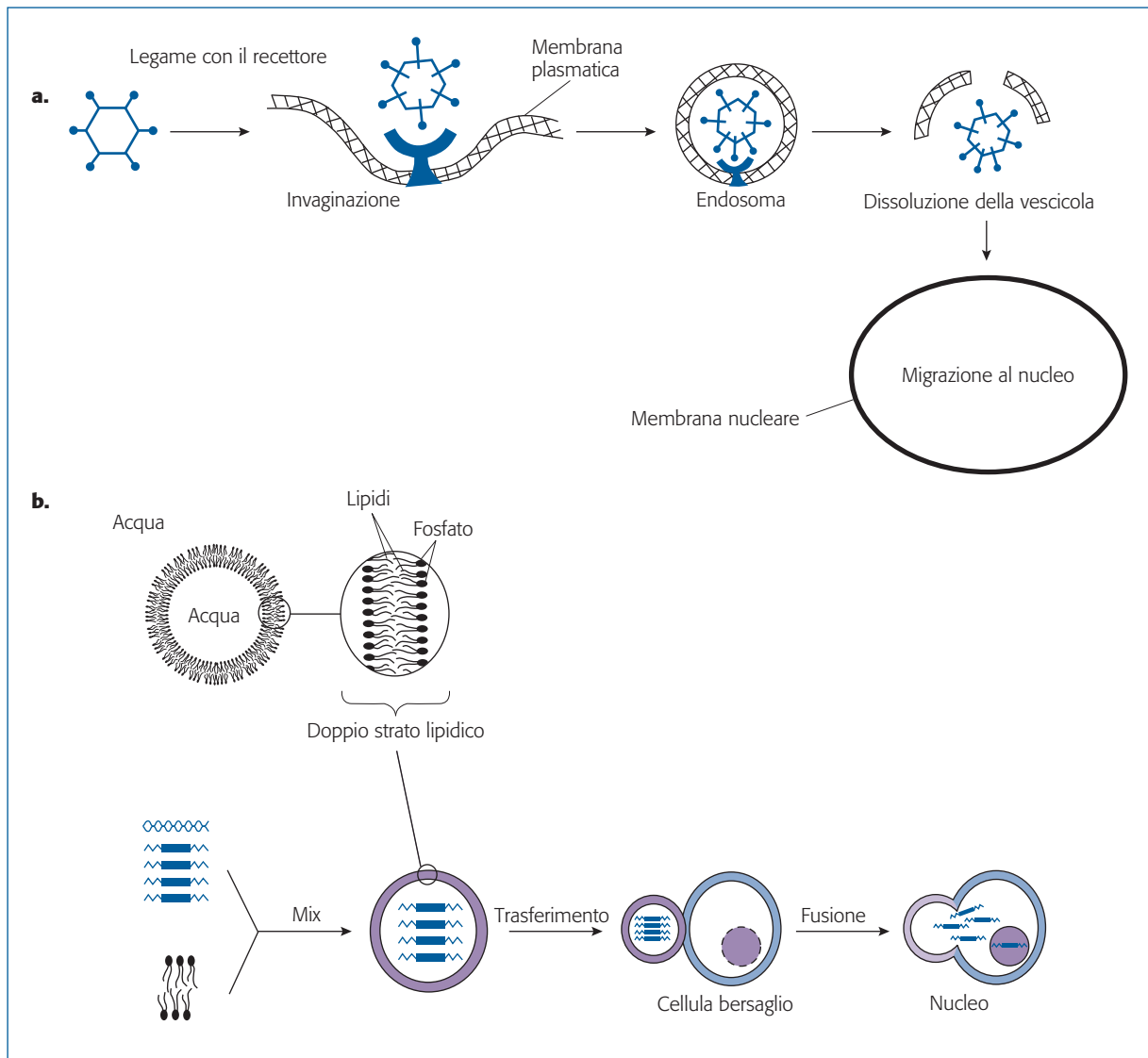


FIGURA 12.13 - Esempio di vettore virale di terapia genica. In questo caso, il virus geneticamente modificato si lega a recettori specifici, presenti sulla membrana cellulare, il virione viene internalizzato. Il genoma virale, libero nel citoplasma, viene trasferito nel nucleo (a). I liposomi sono vescicole formate da un doppio strato fosfolipidico, simile alla membrana cellulare. Il DNA esogeno viene inserito all'interno della vescicola. I liposomi si fondono in maniera aspecifica alla membrana cellulare e il DNA viene trasferito nel nucleo (b). (Modificato da: Strachan T, Read AP. Human molecular genetics. 2nd ed. New York-London: Garland Science, 1999.)

HERPES SIMPLEX VIRUS

Gli **herpes simplex virus** sono del tipo a DNA e presentano uno spiccato tropismo per le cellule neuronali, che possono venire infettate in maniera latente e per periodi di tempo estremamente lunghi. Il loro genoma non si integra in quello dell'ospite. Gli herpes simplex virus possono trasportare inserti di grandi dimensioni (fino a 20 kb).

VIRUS ADENO-ASSOCIATI

Sono probabilmente i vettori maggiormente promettenti, almeno sul versante della sicurezza, dal momento che si tratta di virus difettivi: non sono in grado di indurre infezioni produttive se non in presenza di cosiddetti

virus helper, cioè di agenti virali che possano fornire le funzioni virali di cui sono deficitari. Il vantaggio maggiore degli adeno-associati è che si integrano sempre nello stesso *locus* genomico, sul cromosoma 19q13.3-qter. Il loro limite principale è quello di avere una capacità di trasporto piuttosto limitata, fino a 4,5 kb di DNA genomico.

VETTORI NON VIRALI

L'uso dei vettori non virali è limitato principalmente dalla scarsa efficienza di gene delivery. I sistemi più comunemente usati sono tre: 1) **liposomi**, 2) **iniezione diretta**, 3) **endocitosi mediata da recettori**.

I **liposomi** sono vescicole sferiche delimitate da un doppio strato fosfolipidico, simile a quello della membrana citoplasmatica. Quelli maggiormente usati nei protocolli di terapia genica sono i cosiddetti liposomi cationici, che presentano cariche positive distribuite sulla superficie che interagiscono con le cariche negative del DNA (si veda la Figura 12.13b). Non vi sono limiti alla quantità di DNA che può essere inserito all'interno dei liposomi e l'inserito non si integra nel genoma. Il limite principale alla loro applicazione è la scarsa efficienza di transfezione.

Una possibile alternativa all'uso dei liposomi è l'**iniezione diretta** del DNA esogeno nel tessuto bersaglio. Questo approccio è stato utilizzato, per esempio, per la transfezione di minigeni della distrofina in pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne (si veda il Capitolo 16). Anche in questo caso, l'efficienza di transfezione è piuttosto bassa e ugualmente rara è l'integrazione nel genoma dell'ospite. Infine, l'**endocitosi mediata da recettori** si basa sulla coniugazione del DNA con specifiche molecole che presentano un recettore sulla membrana cellulare. Il limite principale di questo approccio è costituito dal fatto che eventuali sostanze internalizzate con questo sistema vengono indirizzate verso i lisosomi, limitando l'efficienza della metodica. Anche in questo caso non avviene l'integrazione dell'inserito nel genoma dell'ospite.

Terapia genica su cellule somatiche: modificazione dell'espressione di un gene

Buona parte degli obiettivi della terapia genica, descritti sopra, possono essere perseguiti applicando *in vitro* su cellule umane le tecnologie messe a punto per la produzione di modelli animali, soprattutto il gene targeting e la ricombinazione omologa. In particolare, una qualsiasi mutazione può essere virtualmente corretta con l'uso di vettori di targeting adeguati.

Nella maggior parte dei casi si preferisce tuttavia fornire attraverso l'uso dei vari vettori descritti una copia "normale" del gene mutato, in grado di produrre quantità adeguate di proteina. Un primo ostacolo a questo approccio è la dimensione dei geni umani che sono quasi sempre piuttosto grandi, comunque superiori alla capacità di trasporto dei vettori per terapia genica attualmente disponibili. Per questo motivo spesso non è possibile utilizzare geni interi, ma bisogna ricorrere ad alternative quali l'uso di cDNA del gene di interesse, oppure i cosiddetti *minigeni*, cioè costrutti più piccoli che contengono solo una parte funzionale del gene di interesse.

Accanto alle modificazioni a carico del DNA genomico, si sono sviluppati negli ultimi anni approcci alternativi basati sull'inibizione mirata dell'espressione di un gene o sulla correzione di mutazioni *in vivo*. Entrambi questi approcci hanno come *target* gli mRNA mutati, modificando pertanto l'espressione dei geni di interesse a livello della trascrizione. Per il silenziamento dell'espressione genica, uno degli approcci oggi ritenuti più promettenti è quello

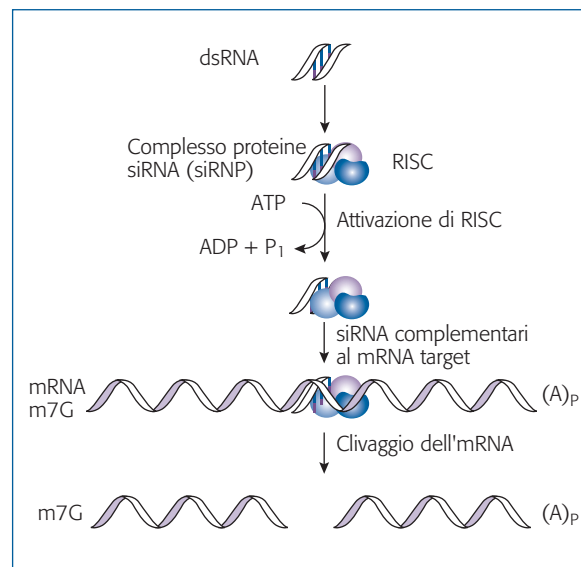


FIGURA 12.14 - Silenziamento genico mediante siRNA. La presenza di piccoli RNA a doppio filamento, specifici per un dato mRNA, induce l'attivazione del complesso RISC, con formazione di siRNP (small interfering Ribonucleotidic Protein). Questo complesso si lega a un mRNA specifico e ne determina la degradazione mediante attività eso-endonucleasica.

dell'**RNA interference** (Figura 12.14), basato sull'uso di piccoli oligonucleotidi a RNA, gli **siRNA** (Small Interfering RNA), complementari all'mRNA d'interesse (si veda il Capitolo 1). Questa metodica si basa su un meccanismo identificato in alcuni organismi inferiori, per il quale piccoli RNA a doppio filamento, i **dsRNA** (Double Strand RNA), presenti nel citoplasma, si legano a un complesso enzimatico, il **RISC** (RNA-Induced Silencing Complex) che riconosce la sequenza di un mRNA specifico e ne induce la degradazione mediante attività eso-endonucleasica. Pertanto la somministrazione alle cellule di oligonucleotidi a RNA, specifici per un mRNA di interesse, potrebbe indurre la degradazione mediante l'attivazione del complesso dsRNA-RISC. Questo approccio potrebbe essere di notevole utilità, per esempio, nel caso di mutazioni gain of function o per ridurre livelli di espressione patologica di alcuni geni quali oncogeni in cellule tumorali.

Per la correzione di mutazioni *in vivo*, oltre alla ricombinazione omologa, esiste un approccio alternativo che si basa sulla scoperta della capacità di alcune molecole di RNA di catalizzare alcune reazioni biochimiche, comportandosi in maniera del tutto simile agli enzimi. Queste molecole sono dette ribozimi e tra le loro funzioni riconosciute vi è la capacità di catalizzare il clivaggio della molecola di RNA e l'effettuazione di un vero e proprio splicing. Si possono pertanto costruire delle molecole ricombinanti che contengano sequenze tipo ribozimi e sequenze complementari all'mRNA mutato, capaci di indurre il clivaggio dell'mRNA e la sostituzione di un frammento mutato con uno wild-type (Figura 12.15).

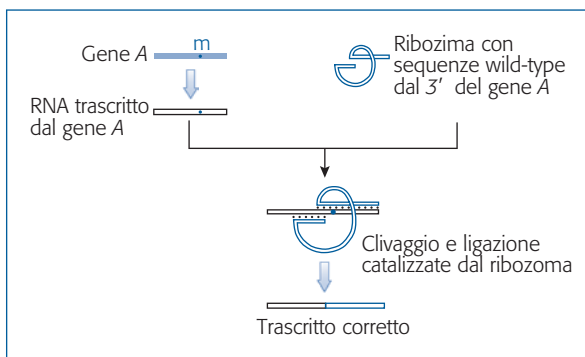


FIGURA 12.15 - Correzione di mutazioni sull'mRNA mediante ribozima. Viene costruita una molecola ricombinante, formata da una regione complementare al 3' del gene mutato e contenente la sequenza wild-type. Una volta avvenuto l'appaiamento tra mRNA e ribozima, quest'ultimo catalizza il clivaggio della sequenza mutata e la ligazione della sequenza wild-type. (Modificato da: Strachan T, Read AP. Human molecular genetics. 2nd ed. New York-London: Garland Science, 1999.)

L'esempio della XSCID

La terapia genica è stata piuttosto deludente sul piano dei risultati *in vivo*, sebbene appaia da sempre molto promettente dal punto di vista teorico e di quello dei risultati ottenuti *in vitro* o in modelli animali. Nel mondo sono attualmente in corso oltre un migliaio di studi clinici di terapia genica, la maggioranza dei quali sono di fase 1, vale a dire effettuati su piccoli gruppi di volontari sani. Oltre il 60% di questi studi clinici sono effettuati in campo oncologico mentre, sorprendentemente, sono meno del 9% quelli che hanno come obiettivo il trattamento di malattie monogeniche. In particolare, la distrofia muscolare di Duchenne (si veda il Capitolo 16), la fibrosi cistica (si veda il Capitolo 27) e due difetti del sistema immunitario, il **deficit di adenosina deaminasi** e il **deficit immunitario combinato grave X-linked** (XSCID, *X-linked severe combined immuno deficiency*) sono stati più spesso oggetto di protocolli di terapia genica.

Quasi tutti gli studi hanno dato risultati abbastanza deludenti, con inconvenienti diversi, quali livelli bassi e non terapeutici di proteina ricombinante o prodotta per periodi di tempo molto brevi, reazione immunitaria del paziente al vettore della terapia genica, basso numero di cellule che esprimevano la proteina ricombinante.

I risultati più incoraggianti si sono avuti nel campo della XSCID, una condizione X-linked recessiva, dovuta a mutazioni della catena γ_c del recettore dell'interleuchina 2 (*IL2RG*). I pazienti affetti da questa condizione presentano un quadro di deficit immunitario a carico dei linfociti B e T; le aspettative di vita sono piuttosto scarse e in genere le complicanze derivano da infezioni opportunistiche, anche se la sopravvivenza dei pazienti è stata notevolmente migliorata dal trapianto di midollo osseo allogenico.

Per le sue caratteristiche, la XSCID è stata una condizione molto attraente per sperimentazioni di terapia genica: le

cellule bersaglio appartengono al sistema circolatorio, il deficit immunitario primitivo dei pazienti riduce il rischio di risposta immune contro il vettore, le aspettative di vita dei pazienti sono piuttosto ridotte ed è possibile un approccio *ex vivo*.

Nel 2000 è stato avviato un protocollo sperimentale di terapia genica su alcuni pazienti: è stato utilizzato un retrovirus difettivo come vettore del cDNA di *IL2RG* per transfettare *in vitro* cellule staminali ematopoietiche (si veda oltre); le cellule modificate sono state successivamente re-iniettate nei pazienti.

In diversi casi si è ottenuta una notevole e persistente espressione del transgene, fino a due anni e mezzo dal *gene transfer*, con una quasi normalizzazione del quadro clinico ed ematologico. Con questo protocollo di terapia genica *ex vivo* sono stati trattati nel complesso all'incirca 20 pazienti.

Come riportato in precedenza, si sono tuttavia verificati cinque casi di leucemie secondarie per attivazione inserzionale del protooncogene *LMO2* da parte del retrovirus ricombinante, integratosi in prossimità del suo promotore, con decesso di uno dei pazienti trattati. Questi eventi avversi del tutto inattesi hanno avuto come conseguenza, da un lato, la sospensione delle sperimentazioni in corso, ma dall'altro hanno consentito di ottenere informazioni fondamentali sul funzionamento dei vettori retrovirali. In particolare hanno consentito di stabilire che alcuni ceppi di retrovirus tendono a integrarsi nel genoma in prossimità delle regioni regolatrici di diversi geni, non solo protooncogeni.

È disponibile online un database continuamente aggiornato sugli studi clinici di terapia genica approvati in corso nel mondo, da cui provengono i dati qui riportati: www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical.

CELLULE STAMINALI

Prometeo rubò il fuoco agli dèi per donarlo agli uomini; per punizione fu incatenato sul monte Caucaso e un'aquila si nutriva quotidianamente del suo fegato, che ricresceva ogni notte. Questo mito incarna una verità scientifica probabilmente già nota nel mondo greco: il fegato è l'unico organo che può rigenerare in seguito a un danno. Tutti gli altri non solo non sono in grado di rigenerarsi ma, fegato compreso, con il passare del tempo vanno incontro all'inesorabile perdita di funzione che prende il nome di *invecchiamento*.

La rigenerazione di un organo e i processi dell'invecchiamento non sono necessariamente correlati, ma una delle teorie più affascinanti in questo campo sostiene che l'impossibilità di rigenerare il nostro organismo e l'invecchiamento in qualche modo rappresentino il prezzo da pagare per limitare lo sviluppo di tumori. Le cellule del nostro organismo, infatti, nel corso della vita vanno incontro a miliardi di divisioni cellulari e se ogni cellula mantenesse inalterata la propria capacità proliferativa, si avrebbe un rischio enorme di trasformazione neoplastica.

Per bilanciare questo rischio la maggior parte delle cellule subisce un processo di differenziazione terminale, mentre soltanto un limitato numero è in grado di mantenere un potenziale proliferativo. Queste ultime cellule vengono definite **staminali**. Anche se sono state identificate in ogni organo e tessuto, non sono ancora completamente noti il loro ruolo e la loro funzione. Tutte le cellule staminali mostrano alcune proprietà fondamentali: sono clonogeniche, sono in grado di rinnovare se stesse e al medesimo tempo possono dare origine a cellule differenziate (attraverso il processo della divisione simmetrica e asimmetrica).

La ricerca sulle cellule staminali è uno degli ambiti più controversi della scienza contemporanea e parte della confusione è generata dall'uso di termini diversi: cellule staminali totipotenti, pluripotenti, multipotenti, cellule *committed* e cellule progenitrici.

Le **cellule staminali totipotenti** sono le cellule staminali embrionali (chiamate anche *blastomeri*) presenti dallo stadio embrionale di 2 cellule fino allo stadio di 8-16 cellule, e sono in grado di dare origine a ogni tipo di tessuto embrionale ed extraembrionale.

Le **cellule staminali pluripotenti** sono le cellule **staminali embrionali**, o **ES**, e rappresentano le cellule della massa interna della blastocisti. È possibile isolarle e mantenerle in coltura per un periodo indefinito e possono dare origine a un embrione completo, tuttavia non sono in grado di originare tessuti extraembrionali come la placenta.

Le **cellule staminali multipotenti** rappresentano le cellule derivate da uno dei tre foglietti embrionali e sono in grado di generare soltanto un limitato numero di linee cellulari: uno degli esempi meglio caratterizzati è rappresentato dalle cellule staminali ematopoietiche che danno origine a tutte le cellule della linea ematopoietica. La definizione di **cellule committed** e **cellule progenitrici** è ancora più difficile delle precedenti: di solito si considerano *committed* cellule che sono andate incontro a parziale differenziazione all'interno di un organo adulto, ma che sono ancora in grado di generare altre cellule identiche a se stesse e cellule differenziate. Le cellule *progenitrici* sono invece in grado di dare origine soltanto ad altre cellule differenziate ma non sono in grado di autorinnovarsi.

Nonostante questi tentativi di definizione, nella maggior parte della letteratura i diversi termini vengono utilizzati in maniera intercambiabile generando ulteriore confusione in un argomento che è ancora oscuro dal punto di vista scientifico. Di solito, l'unica chiara distinzione che viene fatta nella letteratura scientifica è nell'uso dei termini **cellule staminali embrionali** e **cellule staminali adulte**.

La maggior parte delle informazioni a disposizione sulle cellule staminali embrionali derivano da studi su cellule staminali di topo, sia per motivi etici sia perché le cellule ES sono state utilizzate sino dalla fine degli anni Ottanta per generare topi attraverso il *gene targeting* (si veda sopra). Tutti i riferimenti e i concetti sulle cellule staminali embrionali in questo capitolo si riferiscono dunque a dati ottenuti esclusivamente nel topo.

Nella maggior parte dei casi l'unico criterio sperimentale e biologico che definisce una cellula staminale adulta in un determinato organo è il potenziale proliferativo, associato alla possibilità di dare origine ad altre cellule staminali adulte e, al tempo stesso, a cellule completamente differenziate.

L'argomento delle cellule staminali è diventato di notevole interesse scientifico quando si è pensato di utilizzarle come potenziale terapia "cellulare" per patologie come diabete, malattia di Parkinson o distrofia muscolare di Duchenne. L'idea di utilizzarle come "pezzi di ricambio" prevede la loro espansione in coltura, differenziazione e inserimento nell'organo da riparare, rimpiazzare e/o ricostruire, con la speranza di ripristinare la funzione persa. Anche se l'intero processo è stato tentato nel topo e nelle scimmie utilizzando le cellule ES, i risultati positivi non sono molto numerosi e molti sono ancora i dubbi sulla loro reale efficacia.

Per cercare di ovviare al problema del controllo dei processi proliferativi e differenziativi in coltura e cercare di superare i problemi etici legati all'utilizzo delle cellule staminali embrionali umane, è stata rivolta una maggiore attenzione alle cellule staminali adulte.

Le cellule staminali adulte sono state identificate soprattutto nel topo con le tecniche del gene targeting. Alcuni geni tessuto-specifici sono stati utilizzati per identificare cellule proprie di alcuni organi (per esempio, nelle ghiandole mammarie, nell'intestino tenue, nel colon e nella prostata) che avessero caratteristiche di staminalità. Per essere definite tali, le cellule identificate devono poter dare origine ad altre cellule staminali e a cellule differenziate, ed essere in grado di mantenere tali proprietà per tutta la durata della vita dell'organismo a cui appartengono (il topo). La possibilità di purificare e isolare tali cellule ha permesso di ricreare *in vivo*, a partire da una singola cellula staminale, intere strutture ghiandolari, come nel caso della ghiandola mammaria e della prostata; inoltre singole cellule staminali intestinali in particolari condizioni di coltura *in vitro* sono state in grado di generare strutture molto simili alle cripte intestinali. Questi esperimenti hanno fornito la prova definitiva che tali cellule sono realmente staminali, poiché in grado di "ricostruire" strutture complesse, come, per esempio, una ghiandola mammaria.

La caratterizzazione delle cellule staminali adulte non ha solo un obiettivo conoscitivo-speculativo, ma ha soprattutto lo scopo di identificare le cellule staminali dei diversi tessuti per poterle direttamente espandere *in vitro* sia come modello di studio sia per utilizzarle, eventualmente, come strumento terapeutico.

Un altro organo su cui si è concentrata l'attenzione di molti gruppi di ricerca è il pancreas endocrino. Il diabete mellito è una delle malattie croniche più comuni nel mondo occidentale ed è dovuto a una insufficiente produzione di insulina. Per questo motivo la ricerca di cellule staminali in grado di rigenerare le cellule β del pancreas, produttrici di insulina, è stata fortemente stimolata, in vista della possibilità di espandere tali cellule *in vitro* per poi trapiantarle in pazienti diabetici.

Una delle pietre miliari che hanno segnato questo campo di ricerca è stata la dimostrazione che non esiste una vera e propria popolazione di cellule staminali che danno origine alle cellule β ma che le cellule β stesse, nonostante siano ben differenziate, sono in grado di proliferare e mantenere l'omeostasi tissutale e metabolica senza ricorrere a una popolazione di cellule staminali specializzate. In qualche modo, tale scoperta rende più difficili gli approcci terapeutici al diabete basati sull'ampliamento in coltura delle cellule β pancreatiche, poiché è già noto da tempo che tali cellule presentano capacità proliferativa *in vitro* piuttosto limitata. Altri gruppi di ricerca hanno ottenuto dati contrastanti: recentemente nel pancreas adulto di topo sono state identificate cellule che mostrano caratteristiche di staminalità e che hanno dato origine *in vitro* a cellule β secernenti insulina. Il loro ruolo nel mantenimento dell'omeostasi del glucosio, così come un eventuale ruolo terapeutico in seguito a espansione *in vitro*, non è al momento noto. Di sicuro, allo stato attuale è possibile affermare che lo studio delle cellule staminali adulte nei diversi organi e tessuti è uno degli ambiti più interessanti e promettenti non solo per possibili future terapie cellulari, ma anche perché la caratterizzazione di queste cellule dal punto di vista molecolare permetterà di sviluppare farmaci in grado di modulare le loro normali funzioni. Lo sviluppo di farmaci che interferiscano direttamente con i processi di proliferazione, crescita e differenziazione delle cellule staminali di diversi tessuti rappresenta al momento uno dei punti di forza dello studio delle cellule staminali adulte, in quanto ogni processo patologico, dal cancro all'invecchiamento, può essere correlato a un'alterazione delle proprietà delle cellule staminali dei diversi tessuti.

CELLULE STAMINALI INDOTTE (iPS)

Nel 2009 il premio "Albert Lasker", considerato il premio Nobel americano, è stato assegnato a due ricercatori, John Gurdon e Shinya Yamanaka, che a circa trent'anni di distanza l'uno dall'altro hanno contribuito in maniera diversa al chiarimento del concetto di riprogrammazione nucleare. Gli esperimenti di Gurdon negli anni Settanta hanno dimostrato la reversibilità del programma di differenziazione cellulare. In particolare Gurdon è stato il primo ricercatore a clonare un essere vivente (*Xenopus laevis*, un rospo) a partire dal nucleo di una cellula differenziata di cute, utilizzando il trasferimento somatico nucleare.

Dopo gli esperimenti di Gurdon sono trascorsi oltre vent'anni prima di ottenere il primo mammifero clonato: la pecora Dolly (si veda sotto). Da Dolly in poi è stato clonato ogni tipo di mammifero, a eccezione, finora, dei primati. Nel topo, diversi tipi di cellule differenziate sono stati utilizzati come donatori del nucleo da riprogrammare: linfociti B, neuroni olfattivi e cellule di melanoma. Questo enorme sforzo tecnologico ha confermato tutti i precedenti risultati già ottenuti da Gurdon negli anfibi:

il nucleo di una cellula differenziata (anche con differenziazione estrema, come nel caso di una cellula tumorale di melanoma o di una cellula neuronale) è totipotente e può essere riprogrammato una volta inserito nel citoplasma dell'oozita, sebbene l'efficienza di tale processo sia piuttosto scarsa.

Nel corso degli ultimi vent'anni è stata acquisita ampia conoscenza delle caratteristiche biologiche delle cellule embrionali staminali di topo, che sono oggi geneticamente manipolabili con facilità. L'isolamento delle cellule embrionali staminali umane ha aperto la possibilità di utilizzare le stesse tecniche nell'uomo, allo scopo di curare malattie genetiche o riparare tessuti danneggiati attraverso la cosiddetta terapia cellulare. Tuttavia tali esperimenti sollevano enormi problemi di natura etica (in primo luogo la distruzione di embrioni) e di natura scientifica (come la sicurezza per uso terapeutico di cellule modificate e mantenute in coltura).

Dopo circa trent'anni dagli esperimenti di Gurdon, nel 2007 Yamanaka ha prodotto una soluzione almeno parziale a questi problemi, rendendo immediatamente disponibile all'intera comunità scientifica mondiale una tecnica per ottenere cellule molto simili alle cellule embrionali staminali mediante riprogrammazione di fibroblasti derivati dalla cute. Tali cellule sono chiamate induced Pluripotent Stem cells (cellule staminali pluripotenti indotte) o iPS. Yamanaka ha dapprima studiato i profili trascrizionali di cellule embrionali staminali e li ha confrontati con quelli delle cellule immediatamente differenziate. Ha isolato così diversi fattori che erano presenti solo nelle cellule indifferenziate e rappresentavano quindi dei marcatori di staminalità. Alcuni di questi fattori erano necessari al mantenimento della staminalità, ma nessuno di loro era sufficiente a trasformare una cellula differenziata in staminale. Attraverso un esperimento semplice ed elegante Yamanaka ha dimostrato che una combinazione di tali fattori era invece in grado di riprogrammare una cellula differenziata. Utilizzando 24 proteine espresse ad alti livelli nelle cellule staminali embrionali, Yamanaka è riuscito a ottenere con successo la riprogrammazione di fibroblasti di topo in cellule con caratteristiche molto simili a quelle delle cellule embrionali staminali. Il passo successivo è stato quello di identificare il numero minimo di proteine in grado di raggiungere lo stesso obiettivo. Questo esperimento ha portato all'identificazione dei cosiddetti quattro fattori di Yamanaka, *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*, che hanno aperto la strada a centinaia di altri studi che hanno confermato la "facilità" di tale processo.

Le cellule iPS sono state caratterizzate con gli stessi test molecolari e funzionali a cui vengono sottoposte le cellule staminali embrionali per valutarne la staminalità e la pluripotenza. Esse mostrano inoltre capacità proliferativa indefinita e morfologia e profilo trascrizionale molto simili a quelli delle cellule staminali derivate dalla blastocisti. La loro pluripotenza è stata inoltre validata attraverso test funzionali a stringenza crescente: la capacità di dare origine a tessuti derivati dai tre foglietti embrionali, sia *in vitro* sia *in vivo*, e di generare un topo adulto a partire da poche iPS.

Le linee di ricerca sulle iPS sono attualmente orientate lungo tre principali direzioni: il miglioramento tecnologico per comprendere e rendere più efficienti i meccanismi della riprogrammazione, la possibilità di generare modelli *in vitro* di cellule derivate da pazienti affetti da varie condizioni e, infine, lo studio delle possibili applicazioni nella cosiddetta terapia cellulare. La maggior conoscenza delle iPS ha chiarito che uno dei quattro fattori di Yamanaka, *c-Myc*, è responsabile dell'aumentata incidenza di tumori in topi derivati da queste cellule. Questo risultato ha già portato alla possibilità di ottenere iPS senza l'utilizzo di *c-Myc*, anche se l'efficienza di questa trasformazione è inevitabilmente più bassa.

Per quel che riguarda i modelli cellulari *in vitro*, sono già stati pubblicati alcuni studi in cui è stata ottenuta la produzione di iPS a partire da fibroblasti di pazienti con malattia di Parkinson, sindrome di Down, atrofia muscolare spinale (si veda il Capitolo 16). Lo scopo di tali esperimenti è quello non solo di verificare la possibilità di retro-differenziare cellule portatrici di una condizione monogenica o cromosomica, ma anche, e soprattutto, di cercare di creare, a partire dalle iPS, delle cellule neuronali *in vitro* su cui poter studiare i processi patologici responsabili delle condizioni in esame. Lo studio di molte patologie neuronali è infatti spesso reso difficile dall'impossibilità di avere accesso diretto al tessuto cerebrale colpito: per questo motivo, prima ancora che a scopo terapeutico, le iPS rappresenteranno nei prossimi anni il nuovo "organismo" modello della medicina.

L'ultima linea di ricerca, ancora futuristica, prevede non solo di generare iPS da cellule di pazienti con una specifica malattia, ma anche di "riparare" l'eventuale difetto di tali cellule e andare poi a rimpiazzare nel paziente le cellule "malate" con quelle appena riparate.

Mentre i due punti precedenti rappresentano la realtà della ricerca nell'ambito della riprogrammazione delle iPS, le reali possibilità di usare tali cellule a scopo "terapeutico" sono ancora verosimilmente lontane. I prossimi anni saranno fondamentali per cercare di capire se la terapia cellulare mediante cellule staminali indotte potrà essere considerata un nuovo ed efficace strumento terapeutico.

CLONAZIONE ANIMALE

La clonazione animale consiste nel trasferimento del nucleo di una cellula somatica (**donatrice**) nel citoplasma di un oocita enucleato (**trasferimento nucleare** o **trapianto nucleare**); questo processo dà inizio allo sviluppo embrionale, più o meno come avviene dal momento della fecondazione in poi. L'embrione clonato può essere impiantato in utero e dare origine a un organismo clonato (**clonazione riproduttiva**) oppure le cellule che lo compongono possono essere utilizzate per la produzione di cellule staminali embrionali (**clonazione terapeutica**) (Figura 12.16). In entrambi i casi, l'organismo clonato o le cellule staminali sono geneticamente identiche al donatore del nucleo.

Le conoscenze oggi disponibili indicano chiaramente che la clonazione in generale è una tecnica scarsamente efficiente, dal momento che la percentuale di embrioni che superano le prime fasi dello sviluppo è molto bassa ed è tanto minore quanto maggiore è il grado di differenziamento della cellula donatrice.

Dal 1997, anno di nascita della pecora Dolly, il primo animale clonato, la clonazione riproduttiva è stata applicata alla maggior parte delle specie animali di laboratorio. In generale, solo l'1-3% degli embrioni clonati dà origine ad animali nati vivi a termine di gravidanza, indipendentemente dal tipo di cellula donatrice, e in quasi tutti i casi i neonati presentano alterazioni fenotipiche rilevanti, quali eccesso di peso alla nascita, ingrandimento placentare, insufficienza respiratoria, anomalie a carico di reni, cuore o sistema nervoso centrale. Gli animali che superano il periodo neonatale presentano in età adulta obesità, aumento del rischio di tumori, morte prematura.

Nel caso della clonazione terapeutica, le cellule degli embrioni clonati vengono separate enzimaticamente allo stadio di blastocisti e coltivate *in vitro* come cellule staminali embrionali. Anche in questo caso l'efficienza è piuttosto bassa, sebbene superiore a quella della clonazione riproduttiva. La differenza fondamentale tra sviluppo fisiologico e clonazione consiste nel fatto che nel primo vi sono alcuni eventi prezigotici di riprogrammazione del genoma (imprinting, metilazione del DNA, metilazione e acetilazione degli istoni e modificazioni della struttura della cromatina) che avvengono lentamente, nel corso della maturazione dei gameti; al contrario, negli embrioni clonati questi fenomeni devono avvenire nel breve intervallo intercorrente tra il trapianto nucleare e l'avvio dello sviluppo vero e proprio. La maggior parte degli errori, che verosimilmente determinano la bassa efficienza della clonazione, avviene proprio in questa fase. Infatti, negli embrioni clonati si osservano spesso alterazioni dell'imprinting e della metilazione in generale, mancata espressione di alcuni geni essenziali o espressione precoce di altri, espressione di geni propri della cellula somatica donatrice. Al contrario, i cosiddetti eventi post-zigotici, quali l'inattivazione del cromosoma X o l'allungamento dei telomeri, avvengono in maniera corretta anche negli embrioni clonati.

Un altro dato importante, derivante da questi studi, è l'osservazione che anche cellule differenziate che hanno perduto la capacità proliferativa rimangono totipotenti e possono all'occorrenza differenziarsi in tutti i tipi cellulari.

Per quanto riguarda le applicazioni sull'uomo, se la clonazione riproduttiva è quasi universalmente ritenuta inaccettabile per chiare motivazioni etiche, vi è un dibattito piuttosto acceso sulle possibili applicazioni della clonazione terapeutica. Attraverso questa metodica è infatti possibile ottenere cellule staminali embrionali proprie di un individuo che potrebbero essere differenziate in tipi cellulari specializzati da utilizzare teoricamente per la "riparazione" di tessuti danneggiati. Questo sistema consentirebbe di evitare i rischi di rigetto legati a trapianti eterologhi e potrebbe essere utilizzato, per esempio, nel caso di alcune patologie neurodegenerative quali la ma-

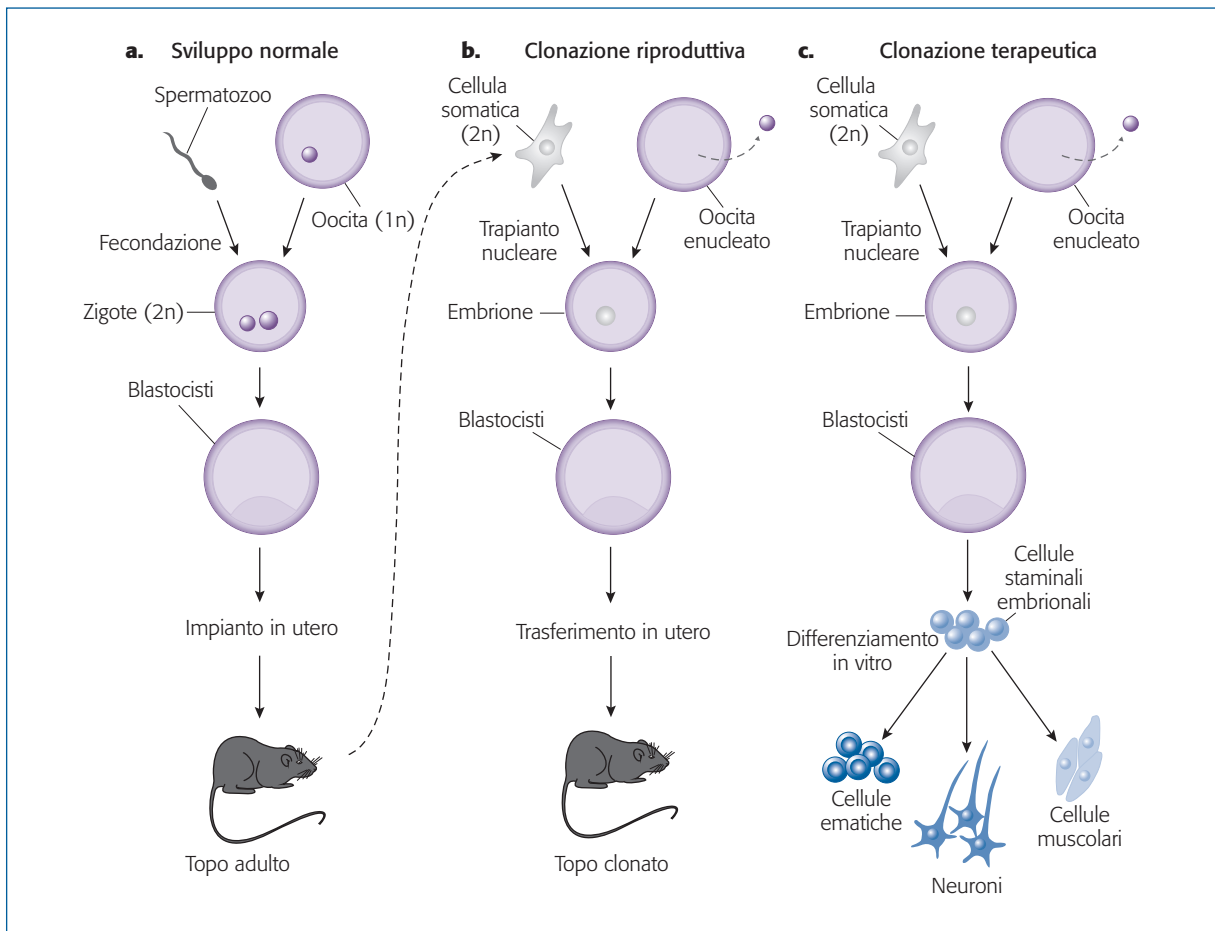


FIGURA 12.16 - Schema dello sviluppo embrionale normale, derivante dalla fecondazione di un ovulo da uno spermatozoo. Entrambi i gameti possiedono un pronucleo con genoma aploide (a). Le due possibili conseguenze del trapianto nucleare, l'espanto del nucleo da una cellula somatica che viene iniettata nel citoplasma di un'ovocita: la clonazione riprodotiva consente di ottenere un animale geneticamente identico a quello di provenienza della cellula donatrice del nucleo (b); il nucleo della cellula somatica viene utilizzato per produrre cellule staminali embrionali del paziente (clonazione terapeutica), le quali possono potenzialmente essere differenziate in diversi tessuti specializzati (c). (Modificata da: Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cell, and the potential for cell therapy. *N Engl J Med* 2003, 349: 275-286.)

lattia di Alzheimer o quella di Parkinson, o in condizioni come il diabete. Anche nel caso di malattie monogeniche, le cellule staminali di un paziente potrebbero essere modificate *ex vivo* e reimpiantate nel paziente.

Senza entrare nel merito di questioni etiche aperte, che esulerebbero dalle finalità di questo capitolo, come per esempio l'opportunità dell'uso di cellule staminali embrionali e il reperimento di oociti umani, chi scrive ritiene che occorra estrema cautela nel proporre applicazioni terapeutiche per metodiche che coinvolgono aspetti della biologia in buona parte sconosciuti. Infatti, sebbene i fautori della clonazione terapeutica sostengano che vi sia un basso rischio nell'uso delle cellule staminali embrionali, non si può comunque escludere che le cellule ottenute per clonazione terapeutica si comportino come una sorta di "bomba a orologeria" una volta impiantate nell'organismo, poiché potrebbero dare origine a neoplasie, come d'altra parte avviene spesso negli animali clonati che arrivano all'età adulta.

L'IMATINIB, LA LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA E LA MEDICINA TRASLAZIONALE

L'insieme delle applicazioni sull'uomo dei progressi delle scienze di base a scopo diagnostico, prognostico o terapeutico, ha dato origine a una nuova branca della medicina sperimentale che va sotto il nome di "medicina traslazionale", dall'inglese *translational medicine*. Il campo di applicazione della medicina traslazionale è molto ampio e riguarda, in generale, le applicazioni cliniche, soprattutto a scopo terapeutico, delle conoscenze dei meccanismi di base responsabili di malattia.

I successi veri e propri della medicina traslazionale sono finora piuttosto limitati; di questi, il trattamento della leucemia mieloide cronica è particolarmente rilevante in quanto costituisce il vero e proprio paradigma di medicina traslazionale. La leucemia mieloide cronica è stata la prima malattia per la quale sia stato identificato un riarrangiamento cromosomico specifico, la traslocazione 9;22, che determina la formazione

di un gene di fusione *BCR-ABL* (si veda il Capitolo 10), ed è anche la prima condizione a beneficiare di un approccio terapeutico mirato al difetto specifico, ossia all'inibizione dell'attività del prodotto proteico del gene di fusione *BCR-ABL*. L'approccio in questione si basa sull'uso di un farmaco, l'imatinib; questo composto appartiene alla classe degli inibitori dei recettori tirosin-chinasici. Negli anni Ottanta la CIBA-Geigy (oggi Novartis) diede inizio a un progetto di sviluppo di questa classe di farmaci sulla base di due tipi di osservazioni: 1) chinasi attivate quali *src* e *abl* hanno un ruolo causale centrale nella trasformazione neoplastica di diversi tipi di cellule; 2) chinasi di questo tipo condividono un dominio di legame per l'ATP altamente conservato. Per queste ragioni furono sintetizzate una serie di piccole molecole, le 2-fenilaminopirimidine, che inibivano in maniera piuttosto selettiva il pathway di trasduzione del segnale del *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), la proliferazione di cellule neoplastiche trasformate con l'oncogene *v-sis*, e l'attività tirosin-chinasica di *v-abl* e della proteina di fusione *BCR-ABL*. A partire dagli anni Novanta, è stata avviata la sperimentazione di una di queste molecole, l'imatinib, in pazienti affetti da leucemia mieloide cronica. Gli ottimi risultati ottenuti in vari studi clinici hanno consentito di ottenere nel 2001 la registrazione presso la Food and Drug Administration (FDA) dell'imatinib per il trattamento della leucemia mieloide cronica e hanno consentito di prolungare la sopravvivenza media dei pazienti affetti da 15 mesi a un'aspettativa di 15 anni.

Tuttavia l'esaltante esempio dell'imatinib è rimasto poco più che isolato: il passaggio dal bancone di laboratorio al letto del paziente ha messo in evidenza come modelli animali e cellulari in realtà non sempre riflettano la complessità e la variabilità della specie umana: i risultati ottenuti *in vitro* o *in vivo* raramente sono stati replicati sui pazienti. Gli studi più recenti stanno evidenziando la complessità dei sistemi biologici, che deriva dalla interazione tra un numero enorme di varianti geniche individuali, più o meno comuni, con fattori ambientali altrettanto variabili (si veda il Capitolo 9). Pertanto lo studio delle varianti geniche deve necessariamente essere integrato nel sistema complesso delle interazioni con RNA e proteine. Il livello successivo consiste nello stabilire correlazioni tra biologia molecolare e fisiologia dei sistemi. I primi risultati non troppo incoraggianti hanno in qualche misura portato alla consapevolezza che il successo della me-

dicina traslazionale è inevitabilmente legato alla creazione di nuove figure professionali altamente specializzate nel settore e alla multidisciplinarietà dell'approccio, derivante dall'integrazione tra industria farmaceutica, innovazione tecnologica accademica e istituzioni con funzioni regolative. È ragionevole pensare che questo tipo di approccio, supportato da investimenti adeguati, possa portare allo sviluppo della cosiddetta *medicina personale*, il cui obiettivo è il trattamento individuale basato sulle caratteristiche proprie di ciascun paziente.

CONCLUSIONI

L'ingegneria genetica è una delle branche delle scienze applicate che hanno avuto negli ultimi anni velocità di progresso sempre crescenti. In questo capitolo si è cercato di effettuare una sintesi, tutt'altro che esaustiva, delle principali applicazioni pratiche dei successi riportati in questo campo. Negli ultimi due decenni si è assistito a un fenomeno probabilmente senza eguali nel campo della medicina: metodiche fino a pochi anni fa di esclusivo appannaggio della finzione cinematografica o letteraria hanno trovato applicazione dapprima su modelli animali di laboratorio e poi anche sull'uomo. Inevitabilmente il passaggio dalla sperimentazione animale a quella umana ha aperto un acceso dibattito sull'opportunità di applicare all'uomo metodologie la cui reale utilità non è stata ancora definitivamente provata. Se, infatti, l'uso delle tecnologie del DNA ricombinante per la produzione di proteine umane in laboratorio ha trovato il plauso e il consenso della comunità scientifica e dell'opinione pubblica (basti come esempio la drastica riduzione dei casi di AIDS nei pazienti affetti da emofilia A, grazie all'uso di fattore VIII ricombinante in sostituzione di quello purificato da sangue, talvolta contaminato dal virus HIV), l'applicazione di protocolli di terapia genica, cellule staminali e clonazione umana (anche a scopo terapeutico) solleva numerose perplessità sia etiche sia scientifiche. Limitandosi al punto di vista scientifico, buona parte della biologia delle cellule staminali è ancora sconosciuta e gli effetti della terapia genica sono stati sino a oggi contraddittori. Se le conoscenze della biologia molecolare e cellulare continueranno a progredire secondo la curva esponenziale attuale, è ragionevole pensare che nel giro di pochi anni si potranno avere risposte convincenti sulla reale efficacia delle metodiche oggi in discussione.

Bibliografia essenziale

Capecchi M. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet* 2005, 6: 507-512.
 Hochedlinger K, Jaenisch R. Nuclear transplantation, embryonic stem cell, and the potential for cell therapy. *N Engl J Med* 2003, 349: 275-286.

Mombaerts P. Therapeutic cloning in the mouse. *PNAS* 2003, 100: 11924-11925.
 Strachan T, Read AP. *Human molecular genetics*, 3rd ed. New York-London: Garland Science, 2003.

Siti Internet

The Journal of Gene Medicine: <http://www.wiley.co.uk/genetherapy/clinical>

